

# Seminar

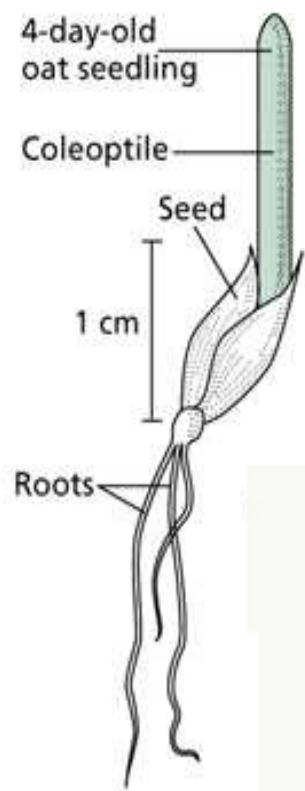
## Molekulare Mechanismen der Signaltransduktion

Gliederung (27.04.2010):

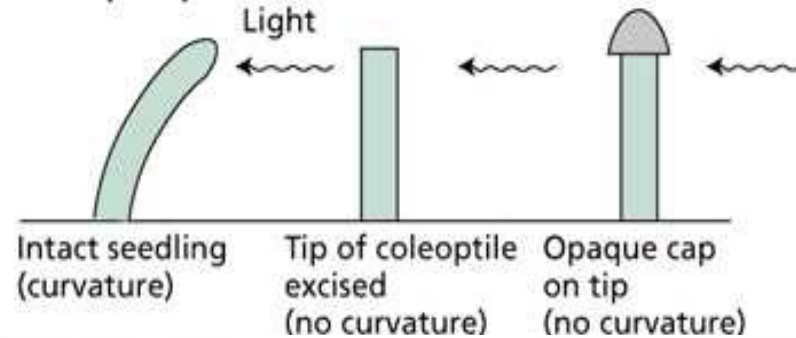
- ✓ Allgemeine Einleitung (Auxin, Nomenklatur....)
- ✓ Vorstellung der ersten paper
- ✓ Termine verteilen

1. Estelle and Somerville, (**1987**) Auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. **MGG** 206:200
2. Lincoln et al., (**1990**) Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. **PC** 2:1071
3. Leyser et al., (**1993**) *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. **N** 364:161

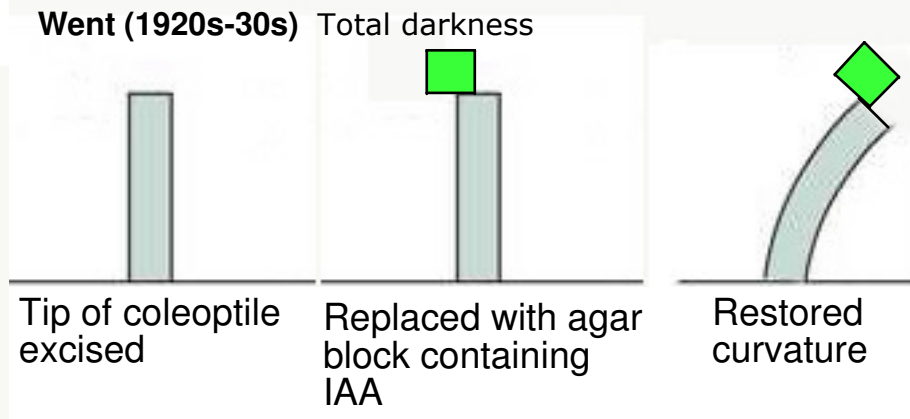
# Auxin - history and pioneering experiments



Darwin (1880)

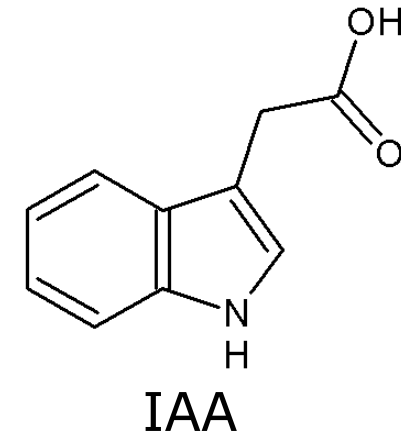


Went (1920s-30s)



"When seedlings are freely exposed to a lateral light some influence is transmitted from the upper part of the coleoptile that acts on the lower part of the coleoptile"

*"The Power of Movement in Plants"* (1880) by Darwin and Darwin.

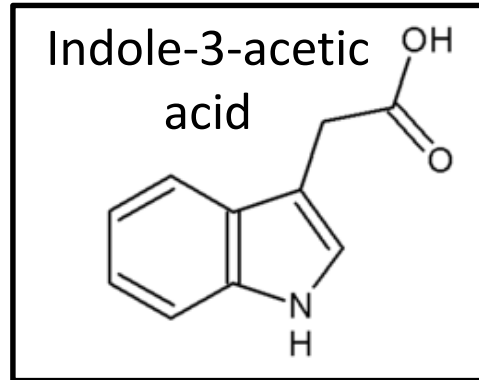


indole-3-acetic acid

- *auxein* (greek) = to grow
- first phytohormone to be identified

# Auxin regulates plant development

---

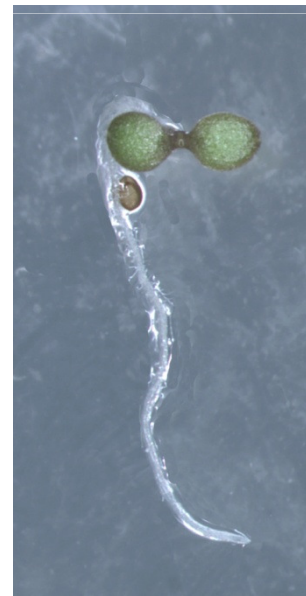


➔ Embryonic patterning

Growth & Apical dominance

Root development

Tropic growth responses



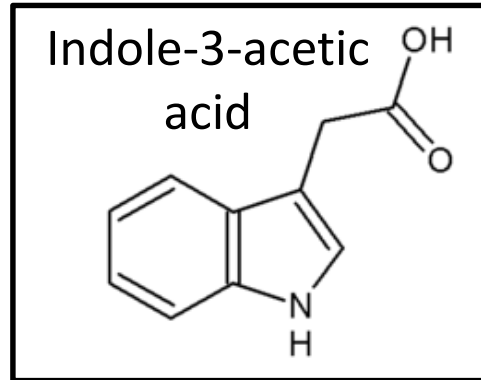
wild-type



*bdl axr1* mutant

# Auxin regulates plant development

---



Embryonic patterning

➔ Growth & Apical dominance

Root development

Tropic growth responses



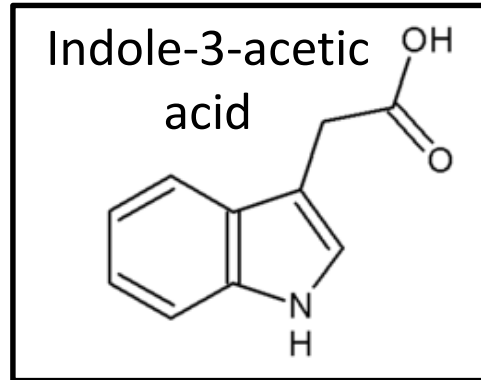
wild-type



*axr6-3* mutant

# Auxin regulates plant development

---

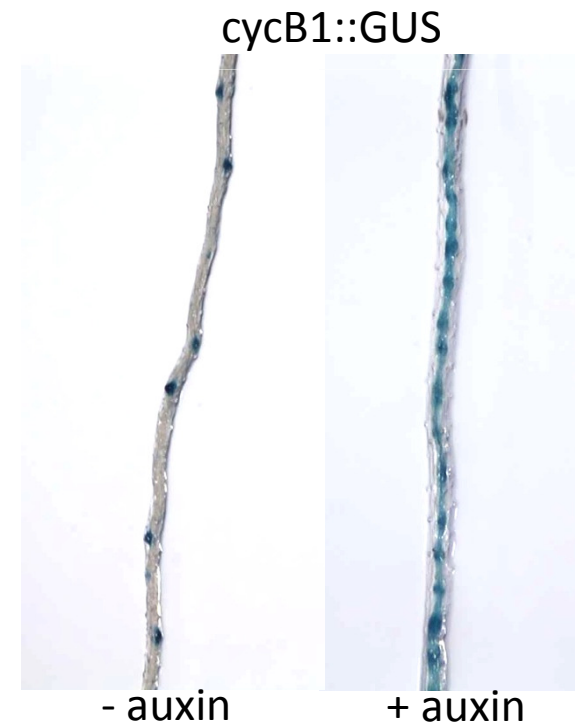


Embryonic patterning

Growth & Apical dominance

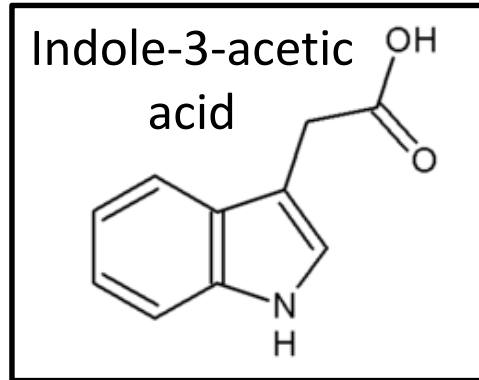
➔ Root development

Tropic growth responses



# Auxin regulates plant development

---



Embryonic patterning

Growth & Apical dominance

Root development

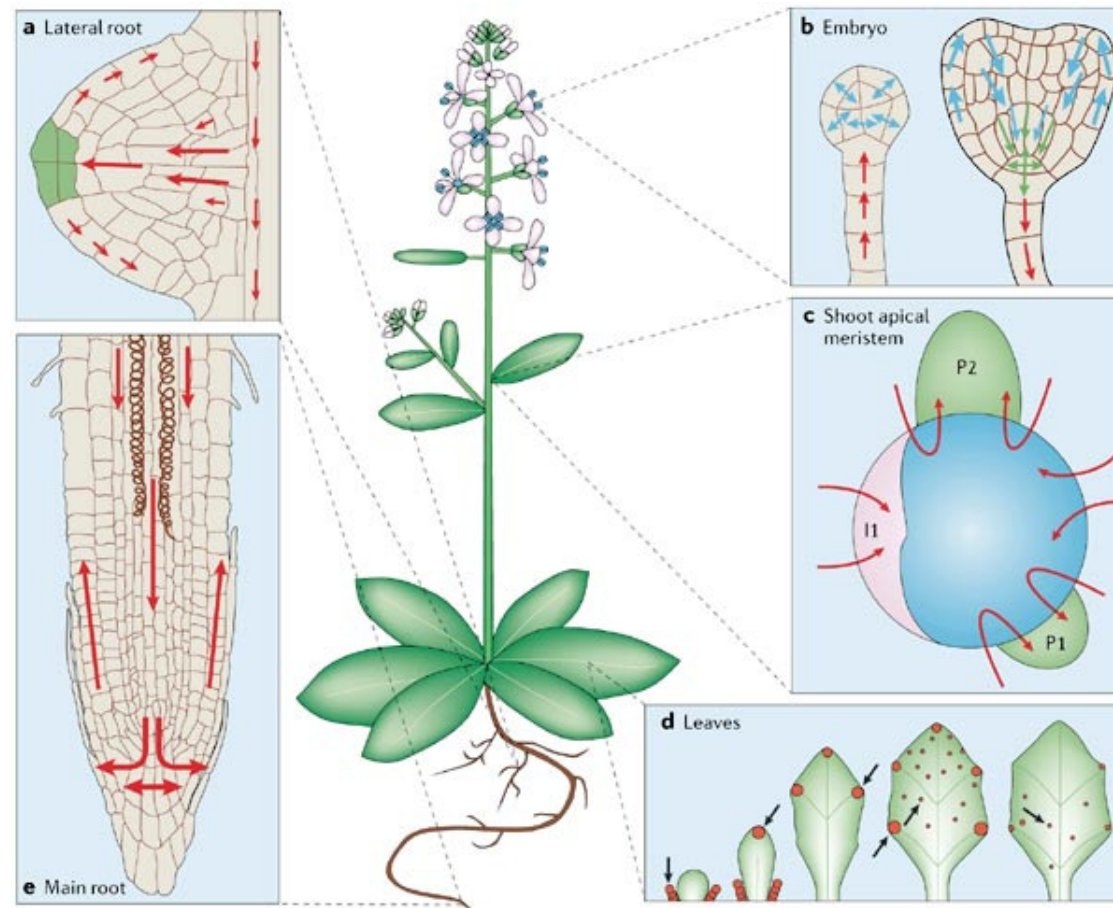
➡ Tropic growth responses



wild-type *aux1* mutant



# Auxintransport

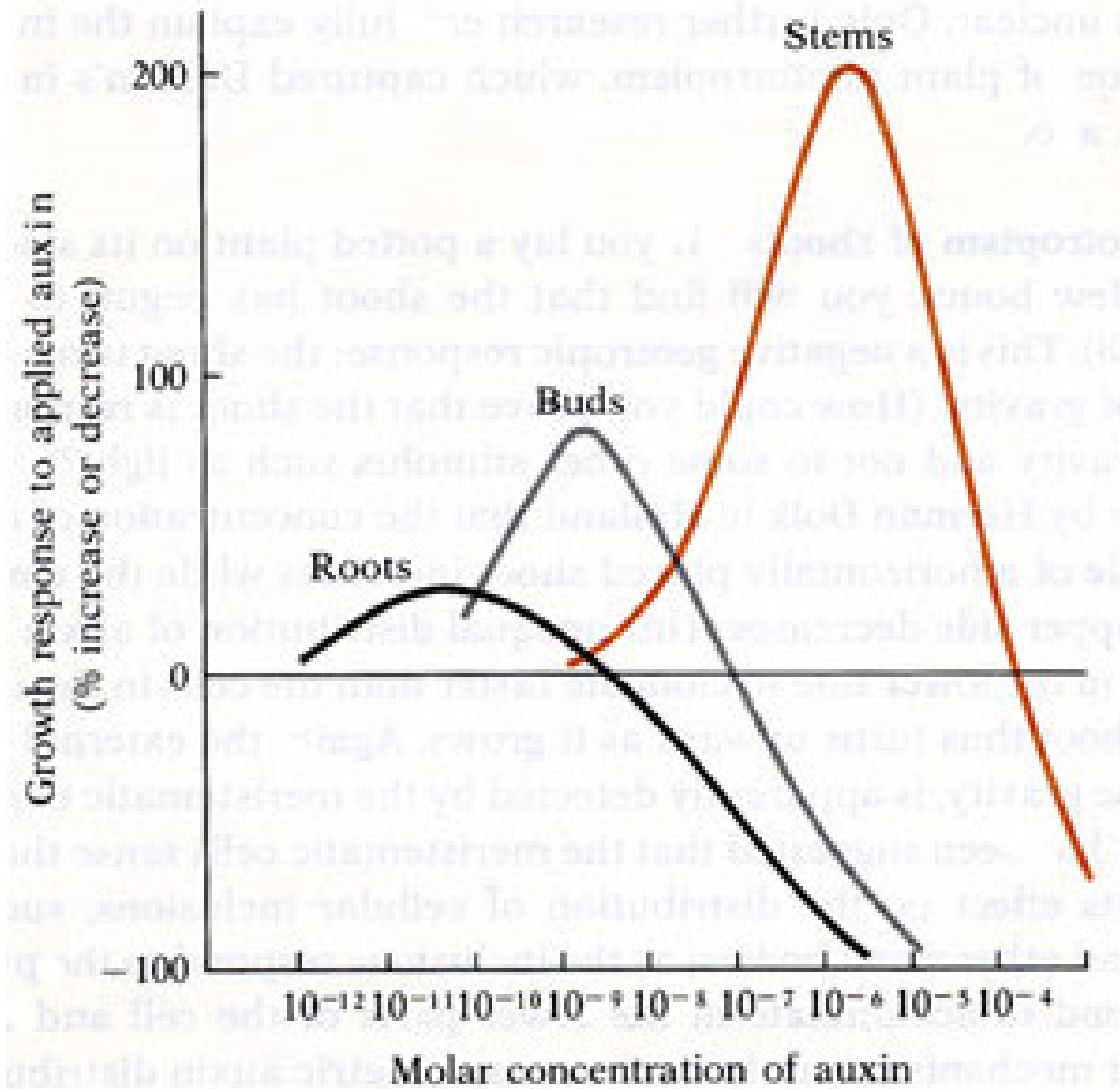


Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

➡ Bildung von Auxingradienten



# Auxin growth responses



# *Arabidopsis thaliana*



Small size	(30 cm)
Rapid life cycle	(6 weeks)
Prolific seed production	(5000 seeds/plant)
Sequenced genome	(125 Mb; ~26,000 genes)
Easily transformable	
Tremendous community resources	

---

**A powerful multicellular eukaryotic model system**

# Allgemeines zur Nomenklatur

---

3 Buchstaben Code:

leitet sich meist von einer Mutante / Phänotyp ab (z.B:  
altered auxin response 1)

- ***AXR1*** - Gen oder Transkript (=mRNA)
- ***AXR1*** - Protein
- ***axr1*** - Mutante mit Defekt im AXR1 Gen
- ***axr1-1, axr1-2, axr1-3....*** - *verschiedene Mutanten des AXR1 Gens (= verschiedene Allele)*
- ***axr1, axr2, axr3.....*** - *Mutanten mit Defekten in verschiedenen Genen*

# Allgemeines zum paper Aufbau / zur paper Präsentation

---

- Abstract
  - Zusammenfassung des papers
- Introduction
  - Einleitung / Vorstellung der Hintergründe
- Materials/Methods
  - was wurde wie gemacht
- Results
- Diskussion
  - Ergebnisse werden evaluiert und in Zusammenhang mit Daten aus der Literatur gebracht
- Literature cited
- Hintergrund / Einleitung / **Ausgangsmodel**
- Zielstellung!
- Ergebnisse (anhand der Abbildungen)
- Diskussion
- Fazit: welche Erkenntnisse sind dazu gekommen
- Model erweitern**

Präsentationen werden nach dem jeweiligen Seminar alle auf die Webseite gestellt!  
<http://quintlab.openwetware.org/Teaching.html>

## **Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology**

**Mark A. Estelle\* and Chris Somerville**

MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

### **Ziel:**

Isolierung von Mutanten, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Auxin aufweisen

Identifizierung von Signalelementen, die an der Auxinresponse beteiligt sind

Zu diesem Zeitpunkt:

- keine Enzyme der Auxinbiosynthese bekannt
- keine Information zu Elementen der Signaltransduktion (weder allgemeine noch gewebsspezifische)
- *Arabidopsis* war noch nicht sequenziert!

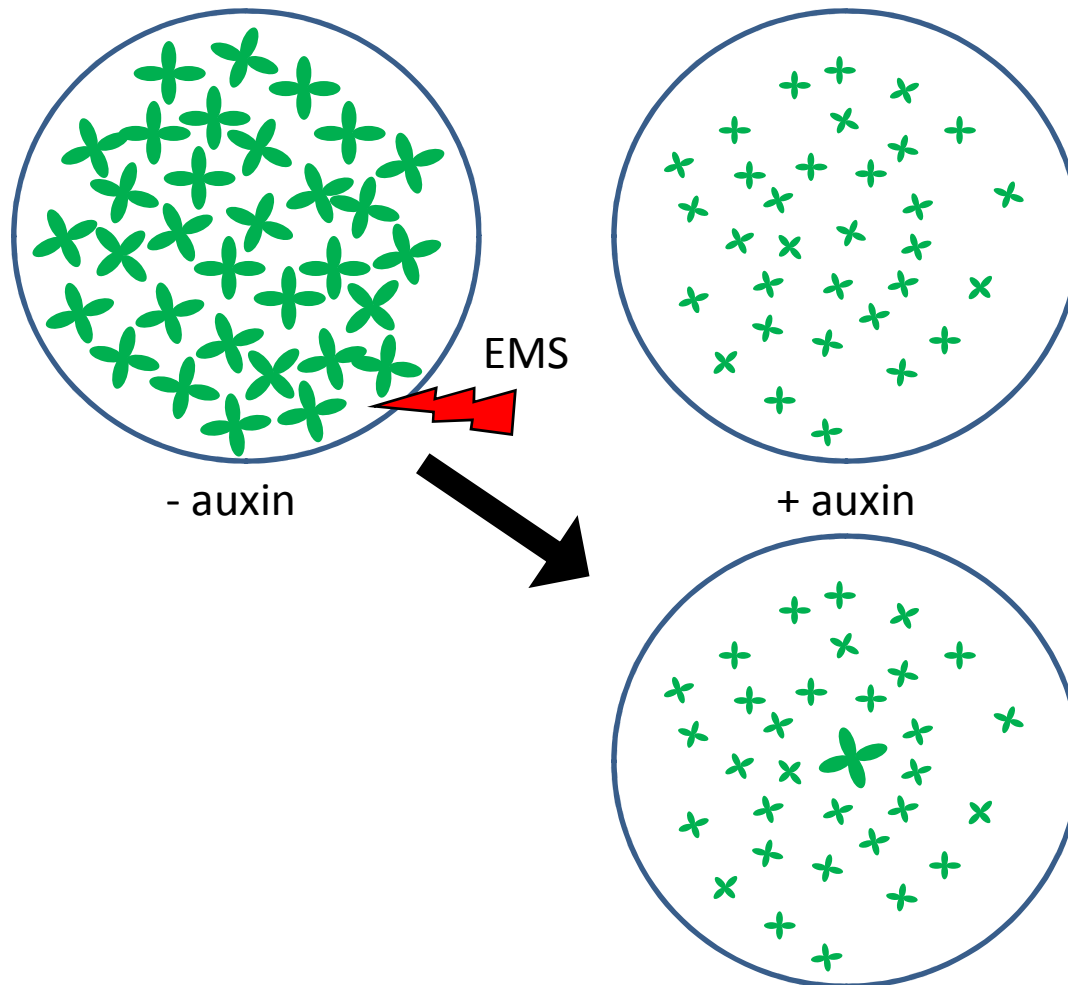
# Mutantenscreen:

1. EMS-Mutagenese von Samen
2. Screen nach Mutanten, die resistent gegenüber der Auxinbehandlung sind

EMS = Ethylmethansulfonat



Basenpaarsubstitutionen von  
G/C nach A/T

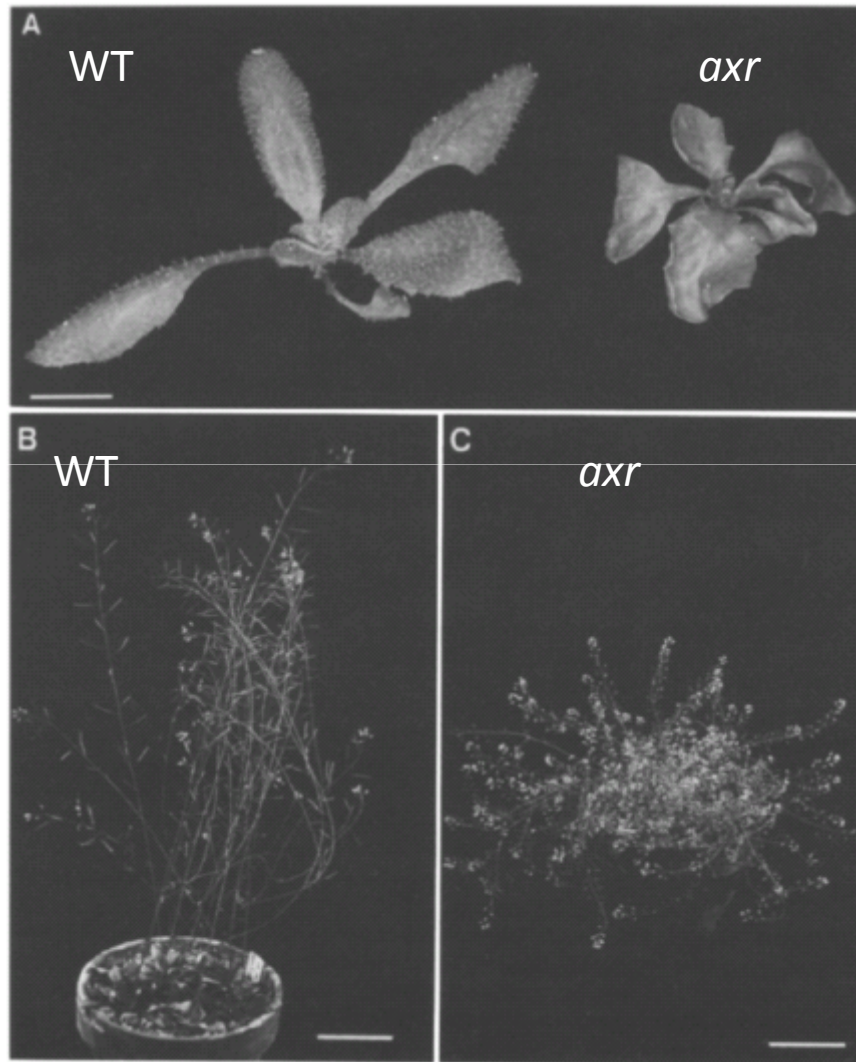


12 *axr* Mutanten  
aus 300 000  
gescreenten

*axr* = altered auxin response

# Phänotypen der *axr1* Mutante

---

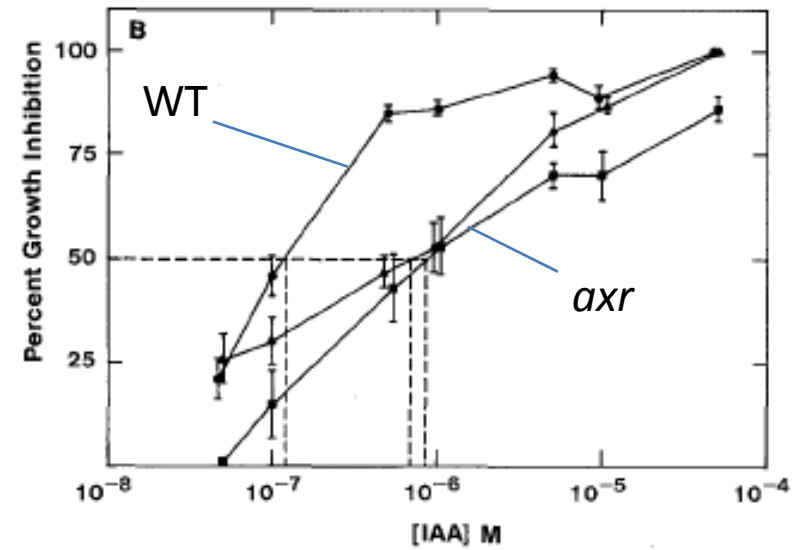
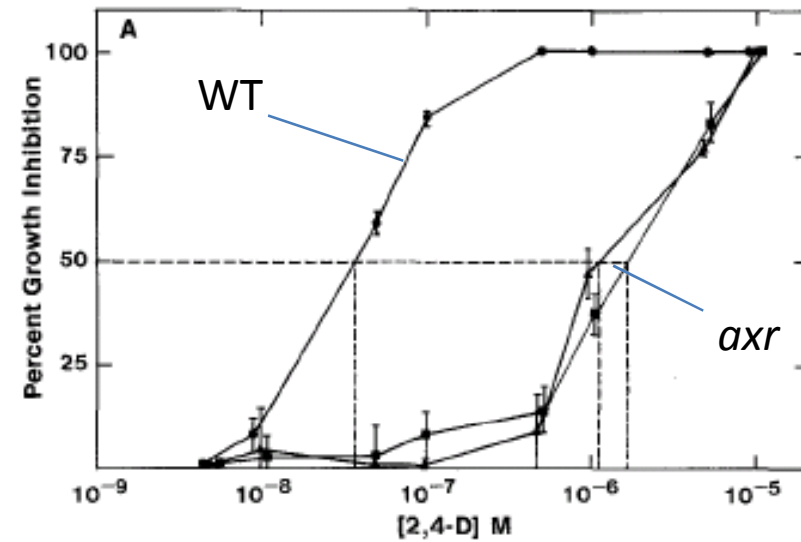
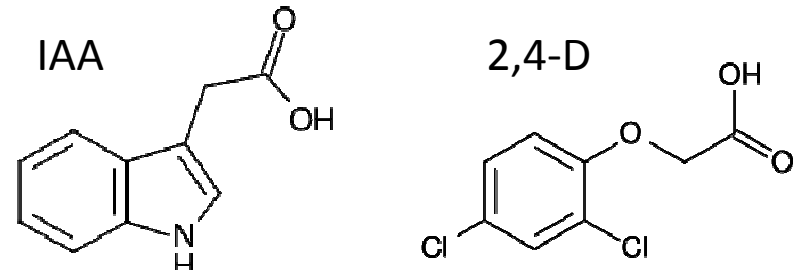
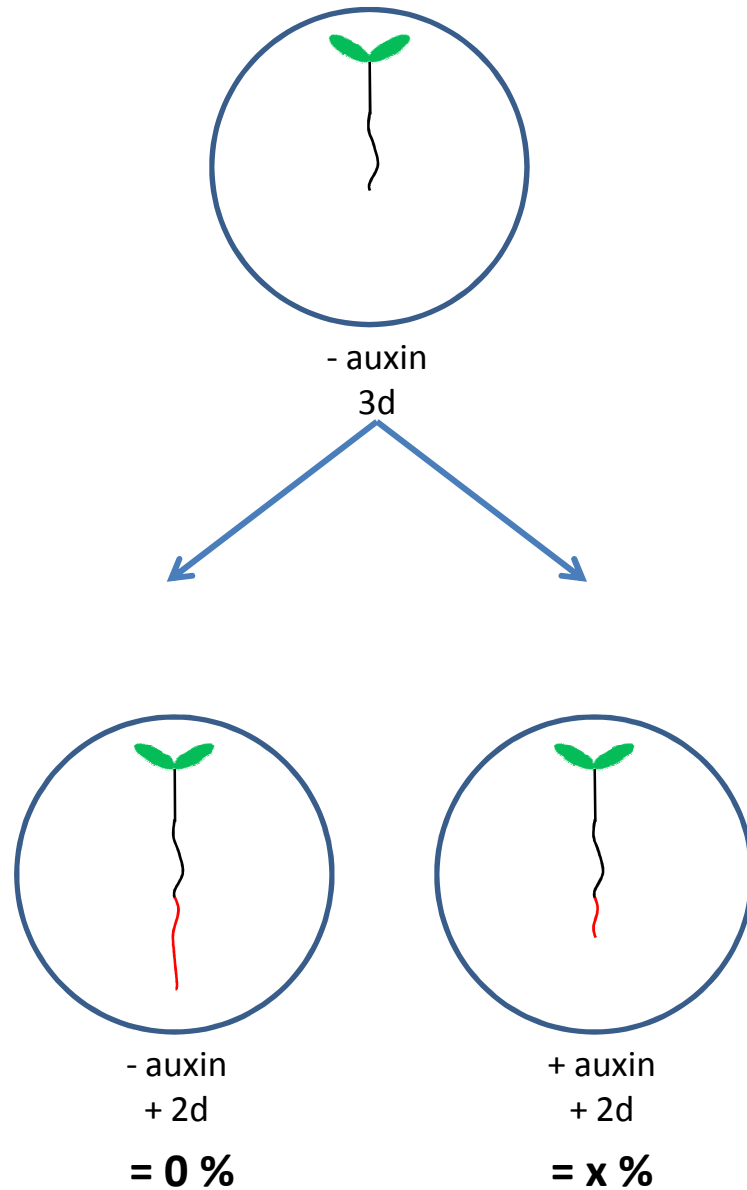


*axr1* Mutanten sind:  
kleiner (Rosette)  
kürzere Blattstiele  
Veränderte Blattform



*axr1* Mutanten bilden vermehrt  
sekundäre Infloreszenzen  
= Verlust der Apikaldominanz

## 2. Wurzelelongation auf Auxin





## **Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology**

**Mark A. Estelle\* and Chris Somerville**

MSU-DOE Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

### **Fazit:**

Isolierung von *axr1* Mutanten mit erhöhter Resistenz gegenüber Auxin, die außerdem zahlreiche Wachstums- und Entwicklungsphänotypen zeigen

eine mögliche Hypothese:

“....An attractive possibility is that the *AXR1* gene coded for an auxin receptor and that resistance is due to an alteration that has a greater effect on the affinity of this receptor for 2,4-D than for IAA.....”

# **Growth and Development of the *axr1* Mutants of *Arabidopsis***

**Cynthia Lincoln, James H. Britton, and Mark Estelle<sup>1</sup>**

Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405

## **Ziel:**

Weitere Charakterisierung der *axr1*-Mutanten  
Kartierung des betroffenen Gens

Table 1. Recovery of <i>axr1</i> Mutants <sup>a</sup>			
M2 population	Mutagen	Selection	Mutants recovered
A <sup>b</sup>	EMS	2,4-D	<i>axr1-1</i>
			<i>axr1-2</i>
			<i>axr1-3</i>
			<i>axr1-4</i>
			<i>axr1-5</i>
B <sup>b</sup>	EMS	2,4-D	<i>axr1-6</i>
			<i>axr1-7</i>
			<i>axr1-8</i>
			<i>axr1-9</i>
			<i>axr1-11</i>
C <sup>c</sup>	EMS	2,4-D	<i>axr1-12</i>
			<i>axr1-15</i>
			<i>axr1-16</i>
			<i>axr1-17</i>
			<i>axr1-18</i>
			<i>axr1-19</i>
			<i>axr1-20</i>
			<i>axr1-21</i>
C <sup>c</sup>	EMS	IAA	<i>axr1-22</i>
D <sup>c</sup>	$\gamma$	2,4-D	<i>axr1-23</i>

<sup>a</sup> A total of 470,000 seeds from four distinct M2 populations was screened for mutants that were able to elongate roots on either 5  $\mu$ M 2,4-D or 50  $\mu$ M IAA.

<sup>b</sup> Estelle and Somerville (1987).

<sup>c</sup> This study.



zu den 12 *axr1*-Mutanten  
noch weitere 8 isoliert

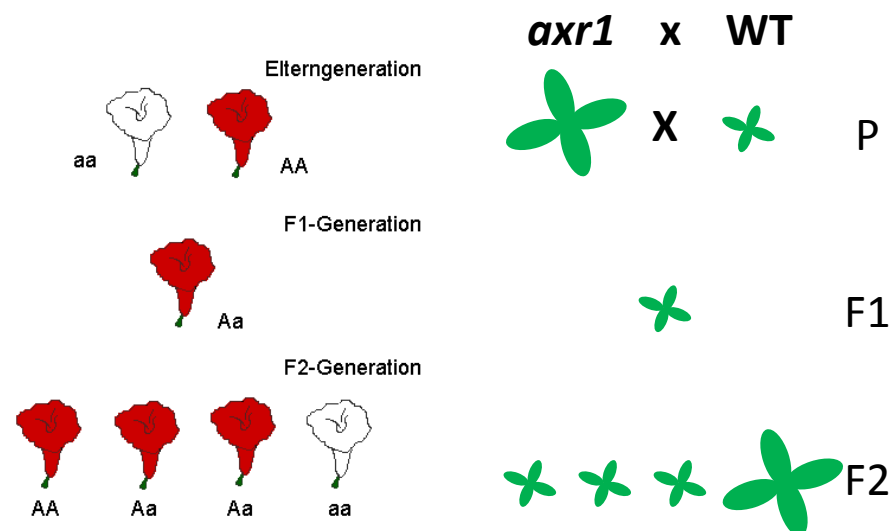


Table 2. Genetic Segregation of 2,4-D Resistance in *axr1* Lines

Cross	Number of Plants		$\chi^2$ <sup>a</sup>
	Resistant	Sensitive	
<i>axr1-19</i> $\times$ wild-type F1	0	23	
F2	186	493	2.07 <sup>b</sup>
<i>axr1-21</i> $\times$ wild-type F1	0	51	
F2	82	281	1.12 <sup>b</sup>
<i>axr1-22</i> $\times$ wild-type F1	0	22	
F2	56	216	2.83 <sup>b</sup>
<i>axr1-23</i> $\times$ wild-type F1	0	33	
F2	117	383	0.683 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $\chi^2$  was calculated based on an expected ratio of three sensitive to one resistant.

<sup>b</sup>  $P > 0.05$ .



*axr1* mutants are recessive

Mutationen allelisch oder in verschiedenen Genen?

→ Komplementationstest auf Auxin

---

*axr1-12/axr1-12*



x

*axr1-3/axr1-3*



F1



oder

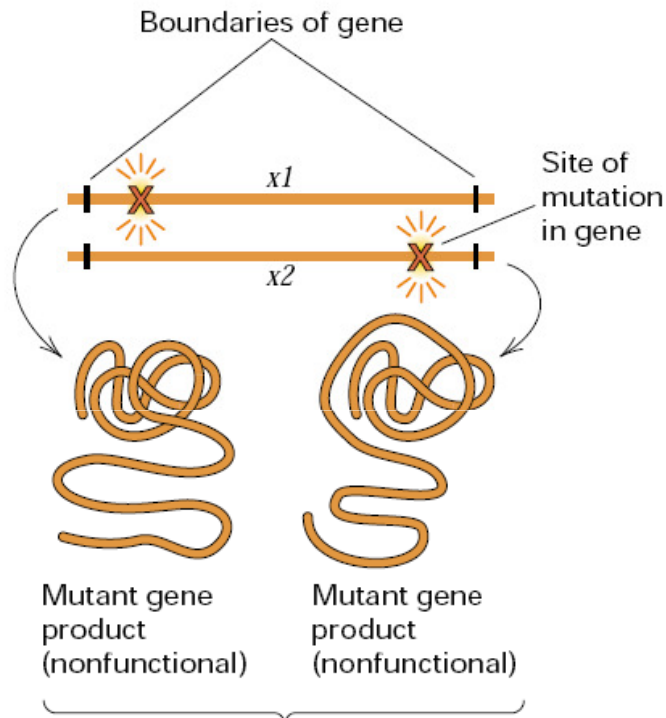


*axr/AXR*

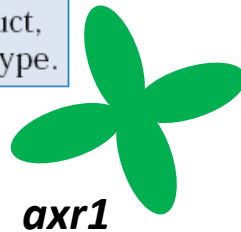
*axr/axr*

# Mutationen allelisch oder in verschiedenen Genen?

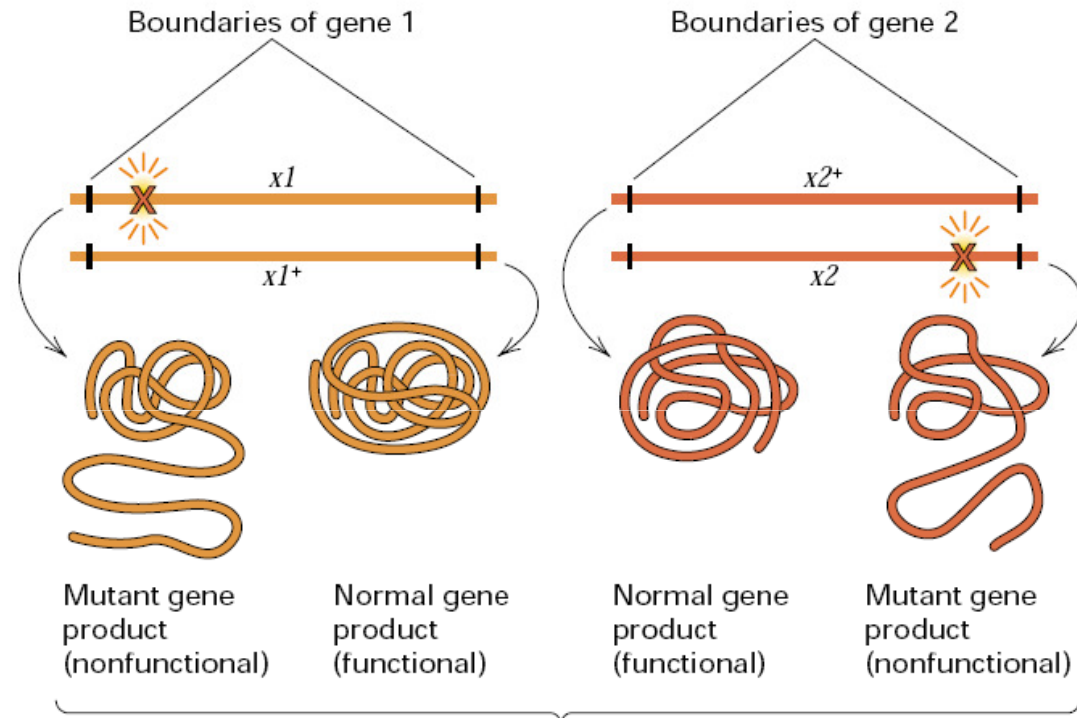
(A) *Trans* heterozygote for two mutations in the same gene



Result: No complementation.  
No functional gene product,  
therefore mutant phenotype.



(B) *Trans* heterozygote for two mutations in different genes



Result: Complementation.  
Functional product from both genes,  
therefore wildtype phenotype.



Mutationen allelisch oder in verschiedenen Genen?

→ Komplementationstest auf Auxin

*axr1-12/axr1-12*



X

*axr1-3/axr1-3*



F1



oder



*axr/AXR*

*axr/axr*

Table 3. Complementation Analysis of *axr1* Lines

Cross	Number of Plants	
	Resistant	Sensitive
<i>axr1-12</i> × <i>axr1-3</i>	33	0
<i>axr1-19</i> × <i>axr1-3</i>	21	0
<i>axr1-20</i> × <i>axr1-3</i>	13	0
<i>axr1-22</i> × <i>axr1-3</i>	24	0
<i>axr1-23</i> × <i>axr1-3</i>	39	0



*axr1*



WT

→ Mutationen sind verschiedene Allele im selben Gen!

# Phänotypen:



**Figure 1.** Phenotype of Wild-Type and Mutant Rosettes.

Rosettes were photographed when the plants were 3 weeks old.

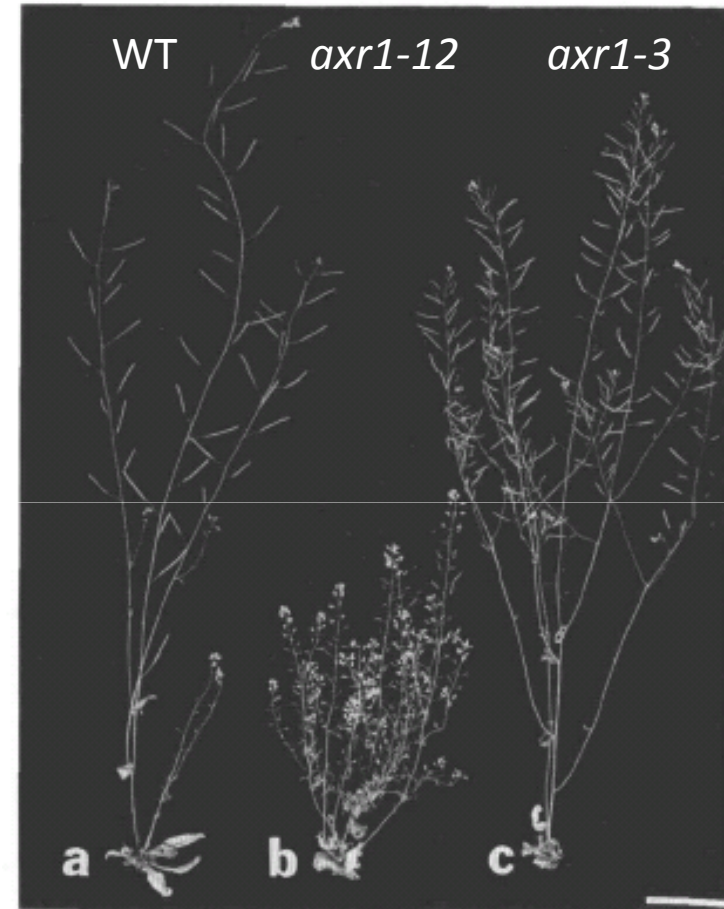
(a) Wild type.

(b) *axr1-12/axr1-12*.

(c) *axr1-3/axr1-3*.

Bar = 1 cm.

→ Allele zeigen unterschiedliche Ausprägung morphologischer Defekte



**Figure 2.** Comparison of Mature Wild-Type and Mutant Plants.

Wild-type and mutant plants were photographed when 7 weeks old.

(a) Wild type.

(b) *axr1-12/axr1-12*.

(c) *axr1-3/axr1-3*.

Bar = 3 cm.

# Quantifizierung morphologischer Unterschiede:

**Table 4.** Morphology of Wild-Type and Mutant Plants

	Wild Type	<i>axr1-3</i>	<i>axr1-12</i>
Height (cm)	50.9 ± 1.0	38.4 ± 1.3	19.2 ± 1.8
No. of inflorescences	5.75 ± 0.25	6.25 ± 1.4	6.6 ± 1.6
No. of lateral branches	46.2 ± 4.5	96.7 ± 21.4	124.0 ± 24.4
Distance between siliques (cm)	0.65 ± 0.04	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.02
No. of siliques	673.75 ± 68.0	526.5 ± 56.0	2.4 ± 1.3
No. of pollen grains/flower	2035.0 ± 500.0	2700.0 ± 337.0	680.0 ± 32.0
Hypocotyl length in etiolated seedlings (cm)	1.40 ± 0.04	1.20 ± 0.05	0.77 ± 0.03

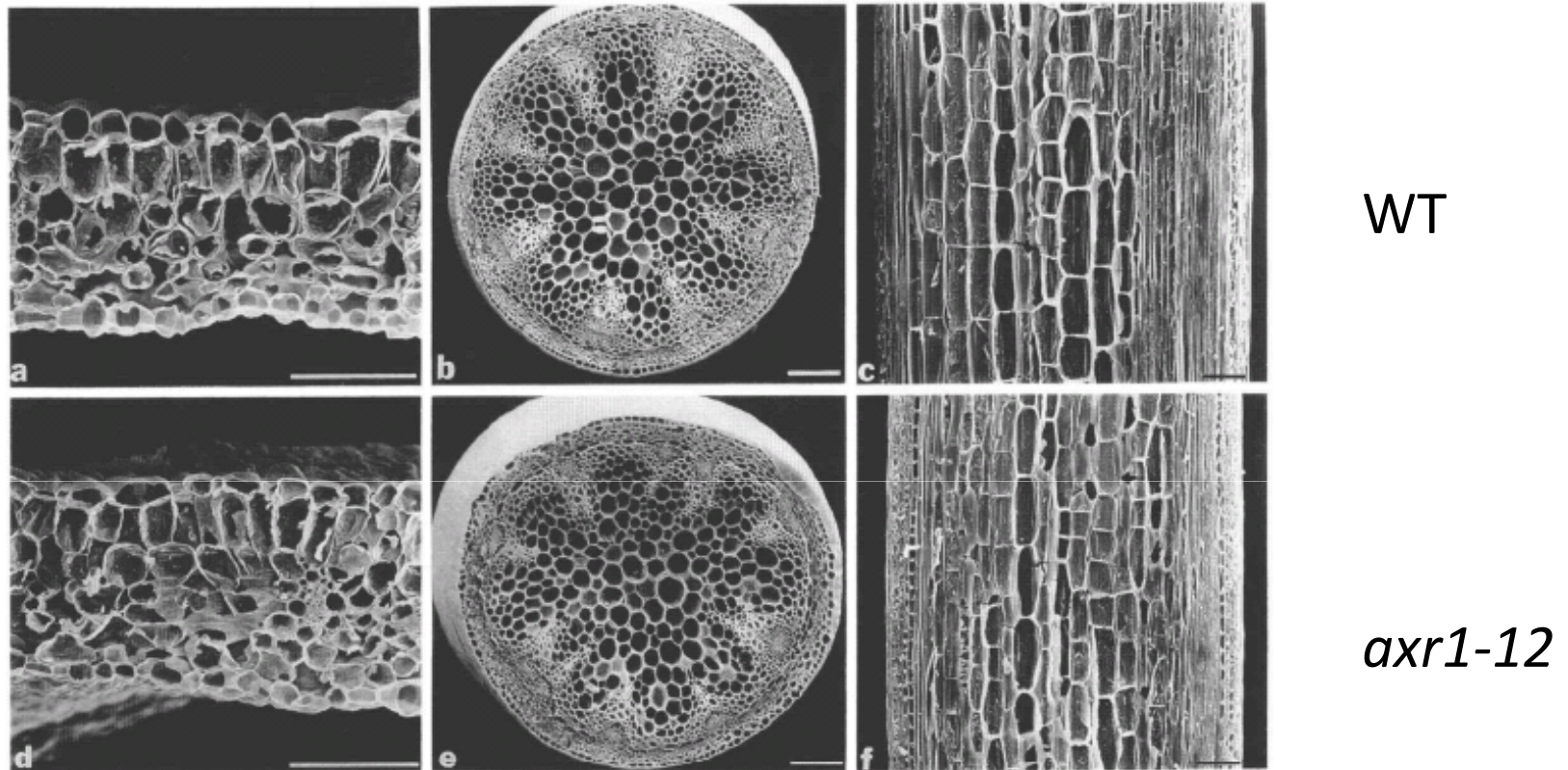


*axr1-3* Mutante zeigt eine schwächere Ausprägung der Phänotypen als die *axr1-12* Mutante



# SEM → morphologische Defekte durch unterschiedliche Zellgrößen oder Gewebeorganisation?

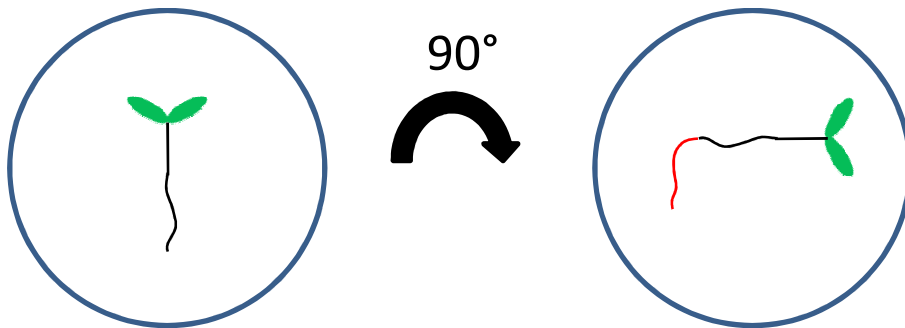
---



- keine wesentlichen strukturellen Defekte
- vaskuläre Strukturen etwas weniger differenziert
- Zellgrößen in etwa gleich = Wachstumsreduktion durch reduzierte Zellteilung

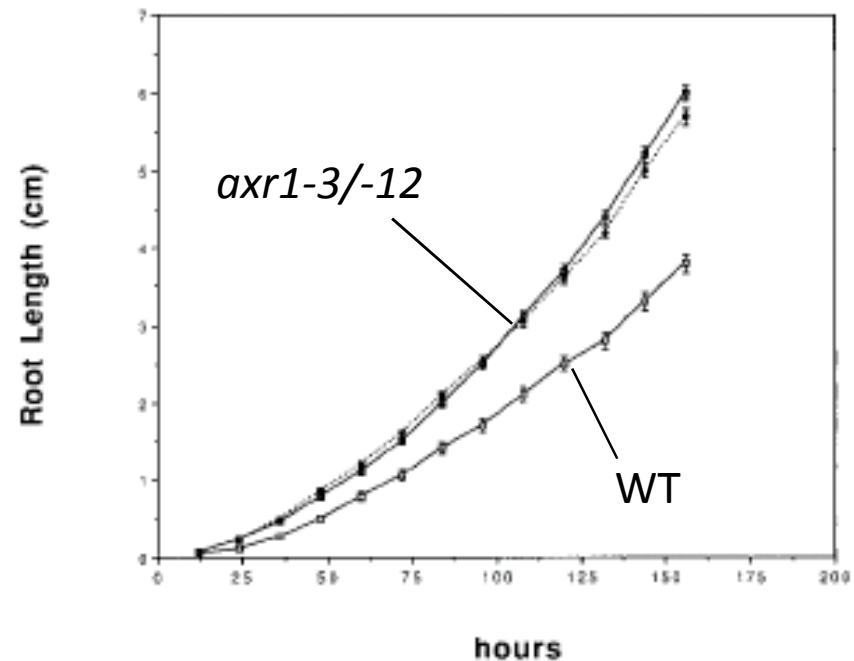
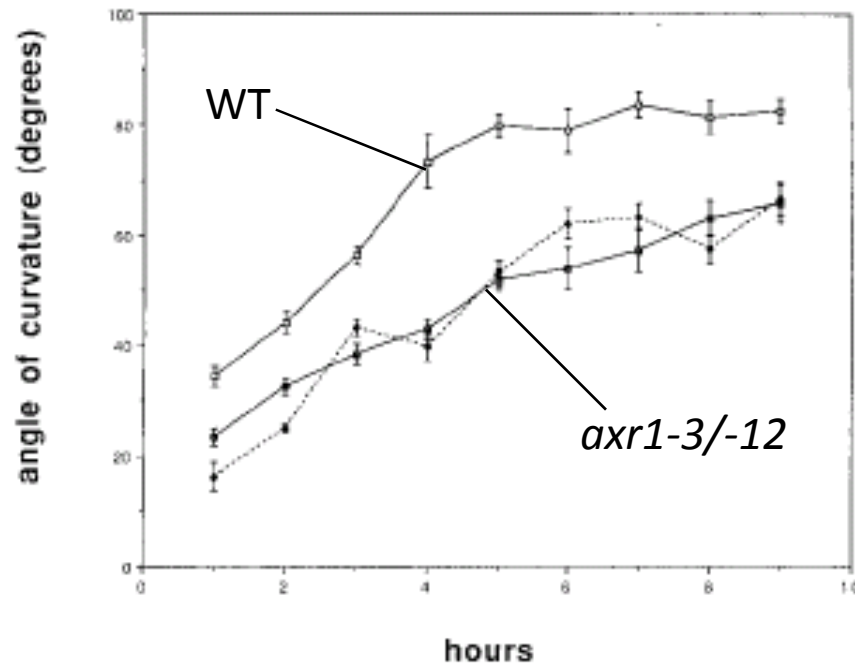
# Auxin Response in der Wurzel:

## 1. Gravitropismus



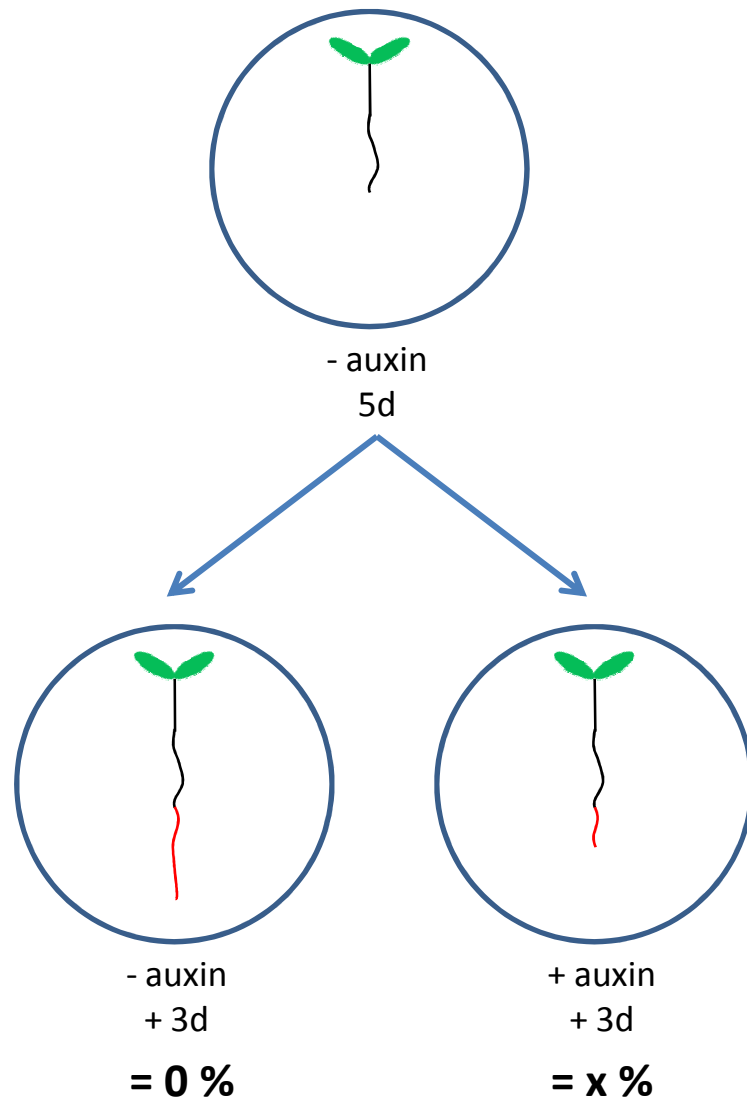
→ Graviresponse in den Mutanten langsamer

→ nicht durch reduziertes Wurzelwachstum!

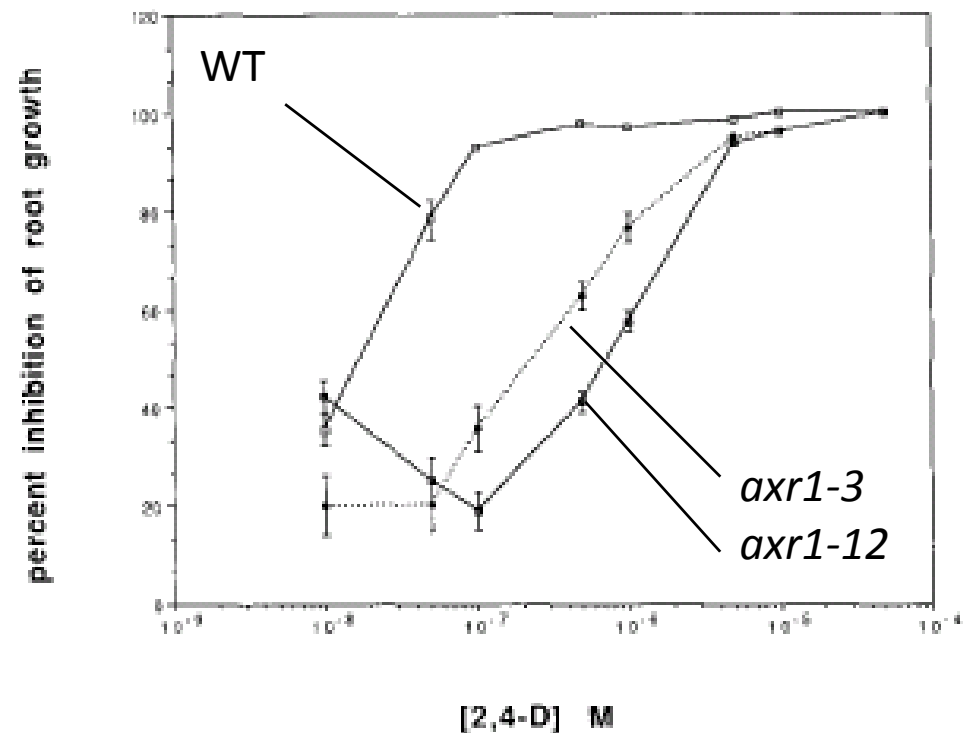


# Auxin Response in der Wurzel:

## 2. Wurzelelongation auf Auxin



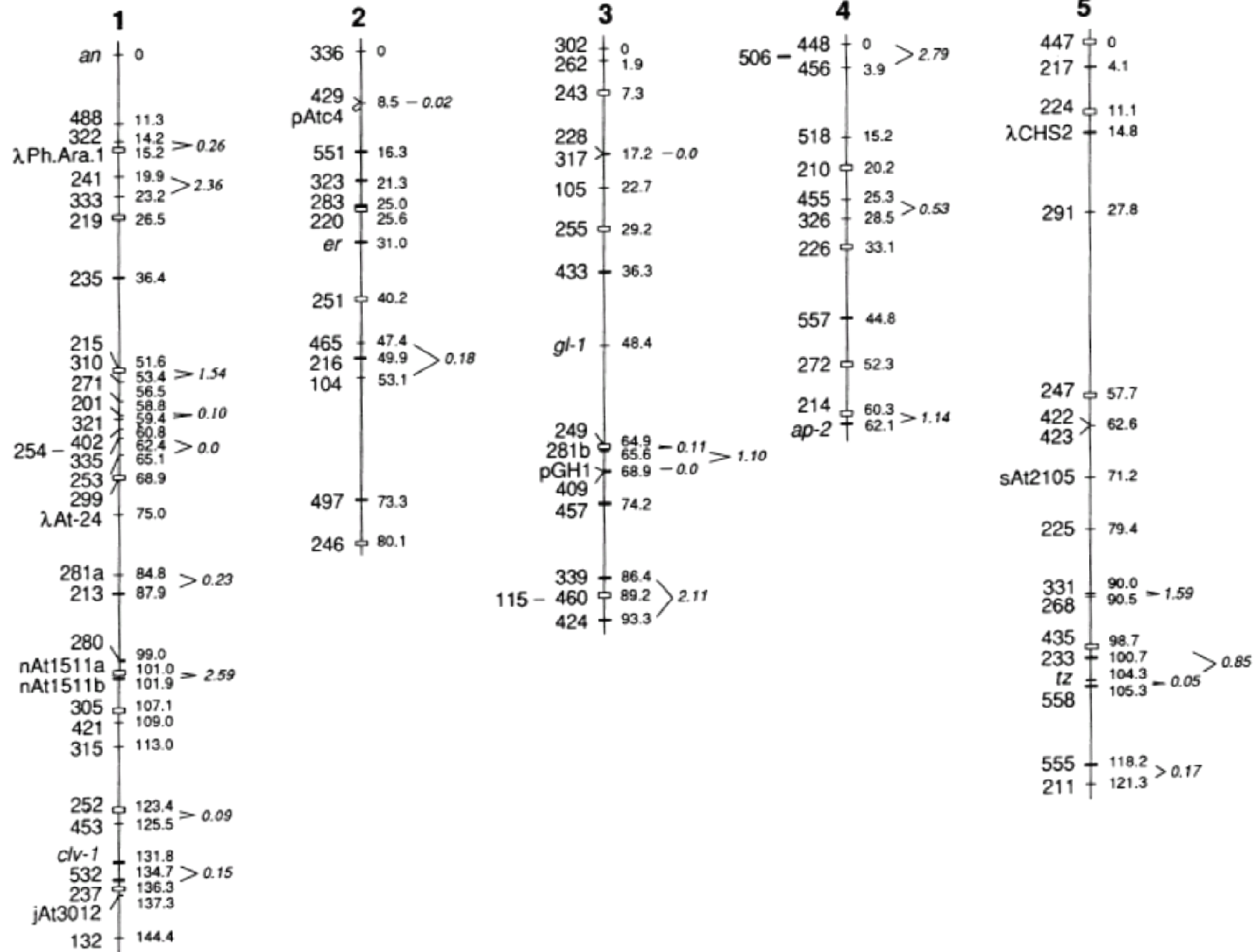
→ klassischer Auxin Response Defekt



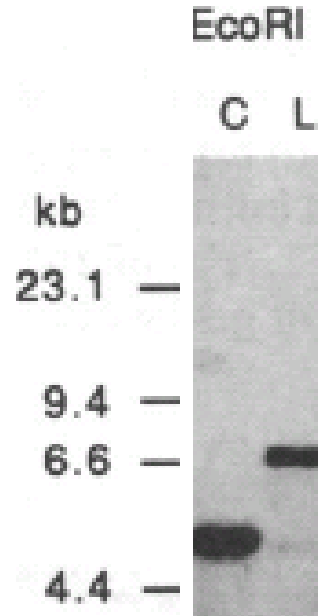
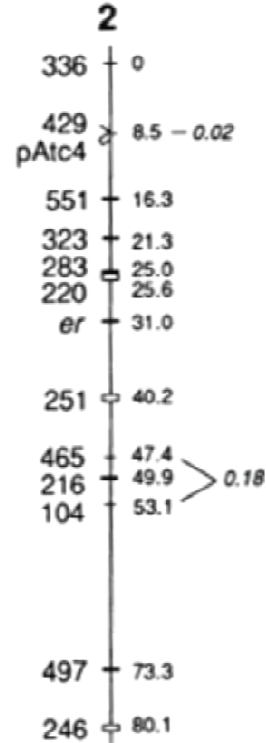
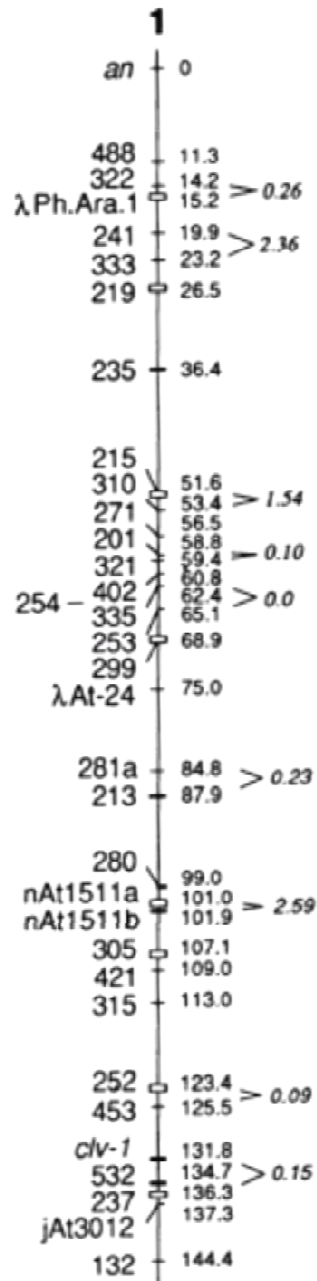
# Kartierung des Gens: Map-based cloning

---

- Voraussetzungen:
  - Spaltende F2-Generation einer Kreuzung aus der Mutante (im Col-0 Hintergrund) mit einem anderen Genotyp (Ler)
  - Molekulare Marker zur Unterscheidung der 2 Genotypen (Col-0 und Ler) z.B. RFLP-Marker
  - genetische Karte der Markerpositionen



# RFLP-Markerkarte



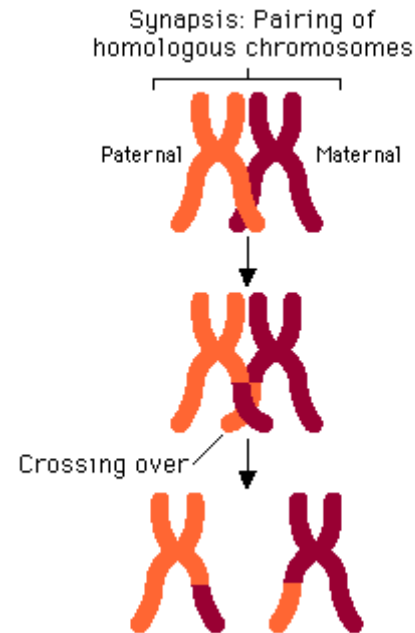
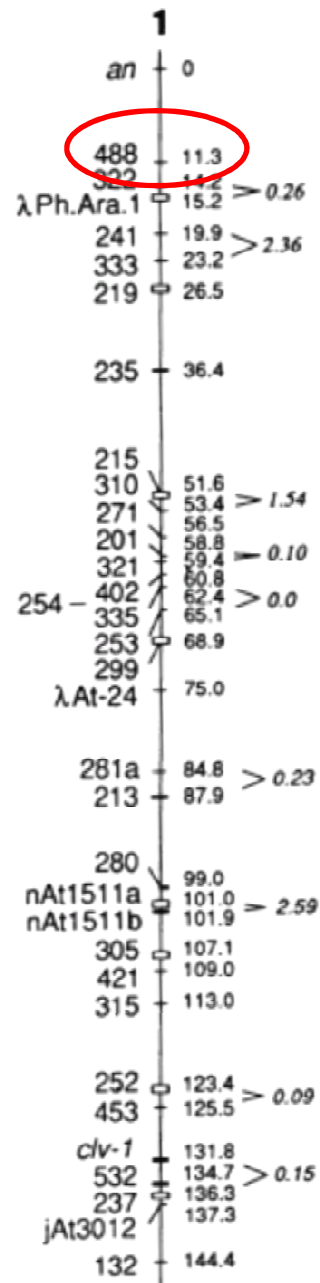
- An verschiedenen Positionen im Genom lassen sich Col-0 und Ler unterscheiden, da die DNA-Fragmente unterschiedlich groß sind (= molekul. Marker)

- Die Lage der Marker zueinander wird über 3-Punkt Analysen ermittelt

# Kartierung des Gens: Map-based cloning

- Voraussetzungen:
  - ✓ Spaltende F2-Generation einer Kreuzung aus der Mutante (im Col-0 Hintergrund) mit einem anderen Genotyp (Ler)
  - ✓ Molekulare Marker zur Unterscheidung der 2 Genotypen (Col-0 und Ler) z.B. RFLP-Marker
  - ✓ Karte der Marker
- Durchführung:
  - Untersucht die F2-Pflanzen auf:
    - *axr1* Phänotyp (= Auxinresistenz und Phänotypen)
    - Genotypen an verschiedenen Markerpositionen
  - Kopplungsanalyse:
    - tritt die *axr1* Mutation bevorzugt mit einem bestimmten Marker auf





je näher das Gen an einem bestimmten Marker liegt, desto weniger Rekombinationsereignisse treten auf (d.h. es liegt hauptsächlich der Col-0 und nicht der Ler Genotyp am Marker vor)

**Table 6.** Linkage Analysis between the *AXR1* Gene and RFLP Markers on Chromosome 1

Markers	Recombination Frequency (%)	Number Scored <sup>a</sup>	$\chi^2$ Associated <sup>b</sup>	P
RFLP 219	12.4 ± 2.0	136	123.3	<0.05 <sup>c</sup>
RFLP 253	47.8 ± 6.3	63	5.6	0.231
RFLP 488	2.6 ± 1.0	99	174.0	<0.05
phyA1	7.1 ± 2.0	102	135.0	<0.05

<sup>a</sup> Refers to number of F3 families scored.

<sup>b</sup>  $\chi^2$  associated is the total  $\chi^2$  adjusted for deviations of each individual marker from Mendelian segregation.

<sup>c</sup> P value < 0.05 indicates deviation from nonlinkage (i.e., linkage).



# Growth and Development of the *axr1* Mutants of *Arabidopsis*

Cynthia Lincoln, James H. Britton, and Mark Estelle<sup>1</sup>

Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 47405

## Fazit:

*axr1* Mutanten zeigen zahlreiche Phänotypen in verschiedenen Geweben (Spross und Wurzel!)

- AXR1 muss ein zentrales Element in der Vermittlung der Auxin response sein
  - auxin rezeptor oder wichtiges Element in der Signaltransduktion
- und/oder: eventuell einen Knotenpunkt darstellen, an dem Signale aus verschiedenen Hormon-Signalwegen zusammenlaufen

Kartierung des betroffenen Gens (*AXR1*) ergab eine Lage auf Chromosom1

***Arabidopsis* auxin-resistance  
gene *AXR1* encodes a protein  
related to ubiquitin-activating  
enzyme E1**

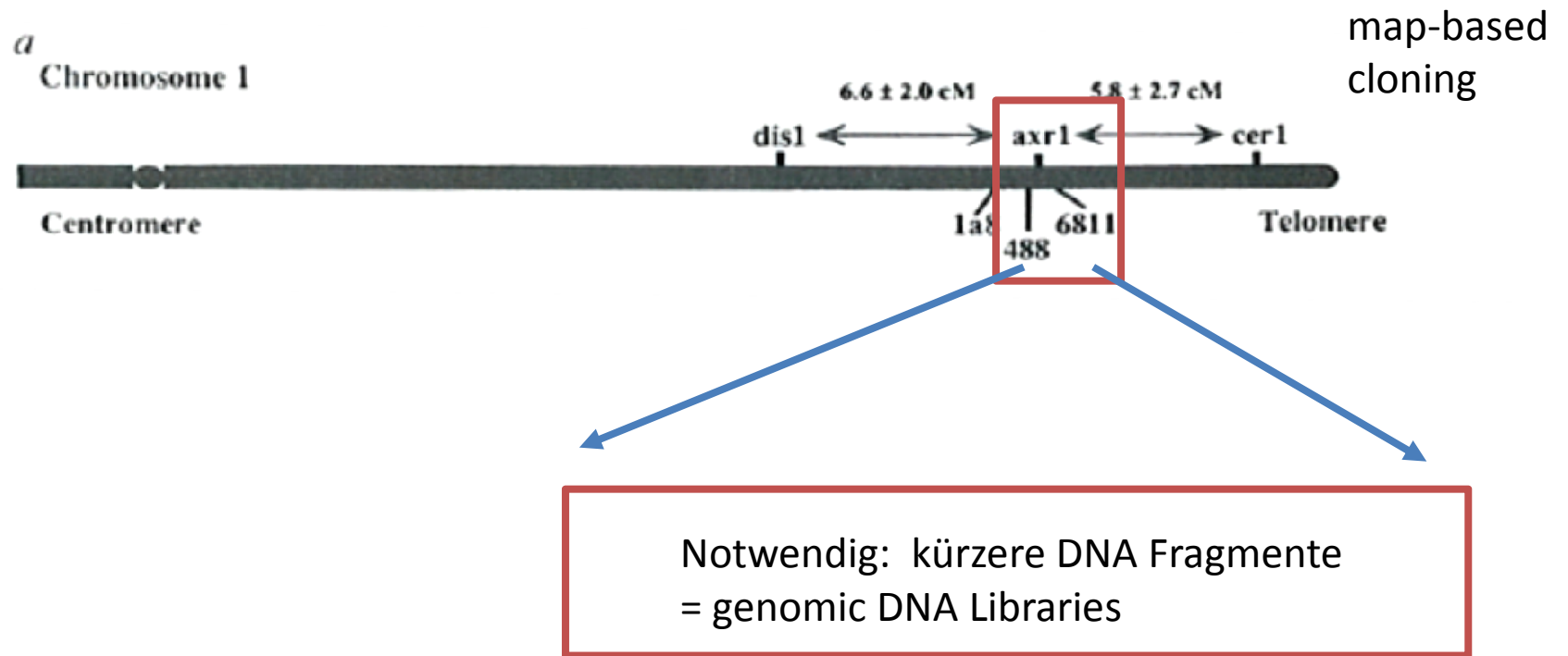
**H. M. Ottoline Leyser, Cynthia A. Lincoln\*,  
Candace Timpfe, Douglas Lammer,  
Jocelyn Turner & Mark Estelle†**

Department of Biology, Indiana University, Bloomington,  
Indiana 47405, USA

---

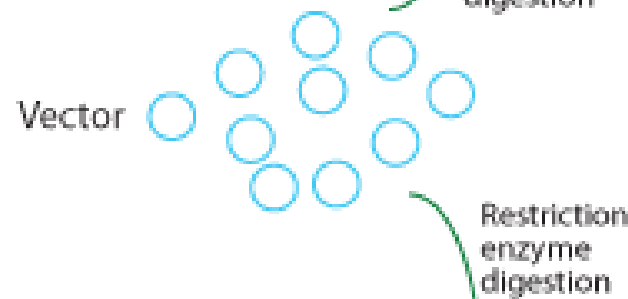
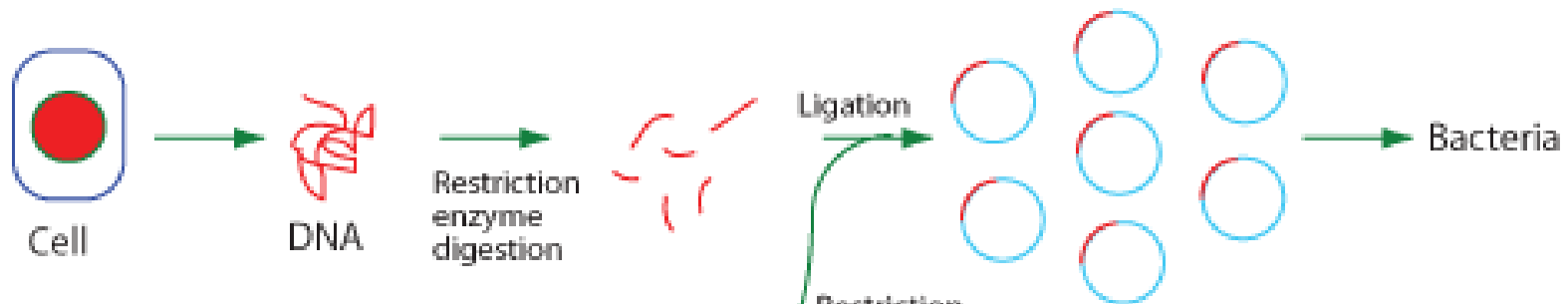
**Ziel:** Kartierung /Identifizierung des *AXR1* Gens

# chromosome walk

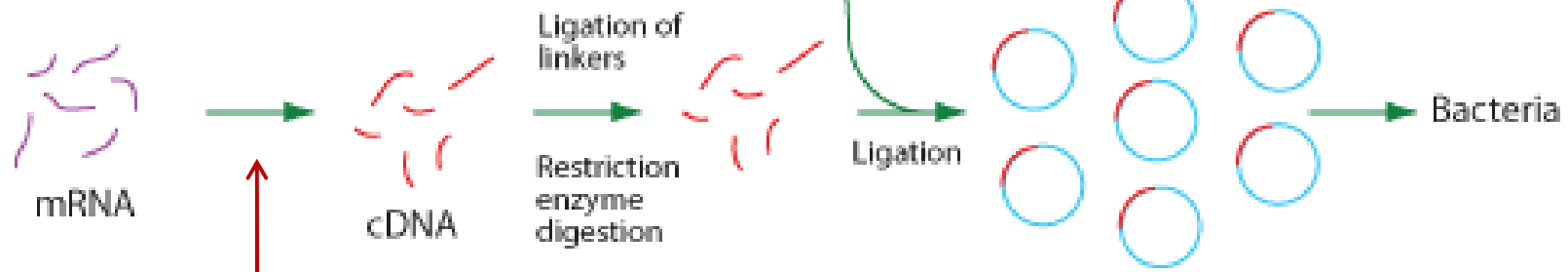


# DNA libraries

## Genomic Library



## cDNA Library



Reverse Transkription

# YACs, cosmids.....

Approximate maximum length of DNA that can be cloned into vectors

Vector type

[Plasmid](#)

[lambda phage](#)

[Cosmid](#)

[BAC](#) (bacterial artificial chromosome)

[YAC](#) (yeast artificial chromosome)

Cloned DNA (kb)

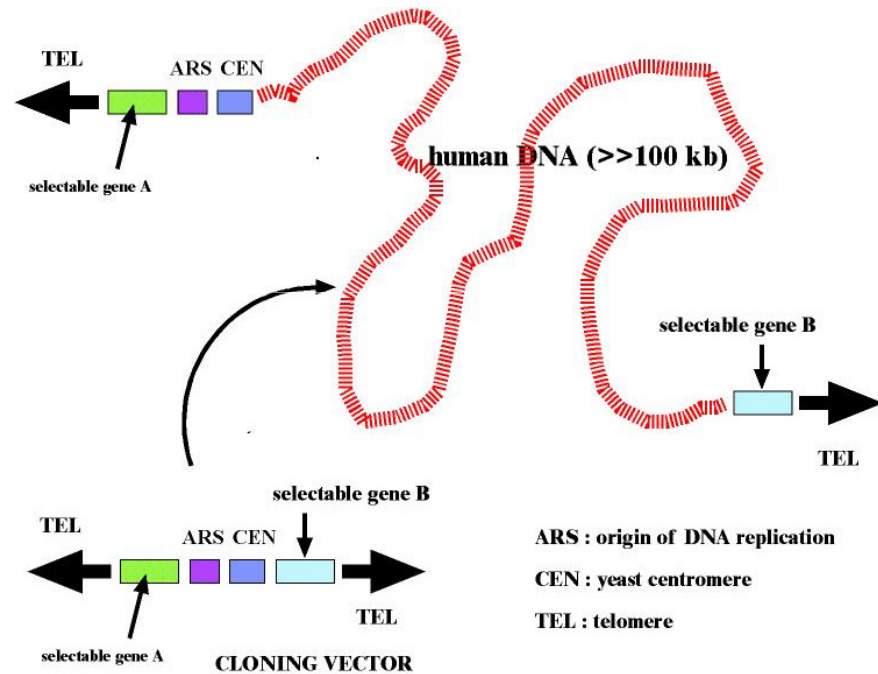
20

25

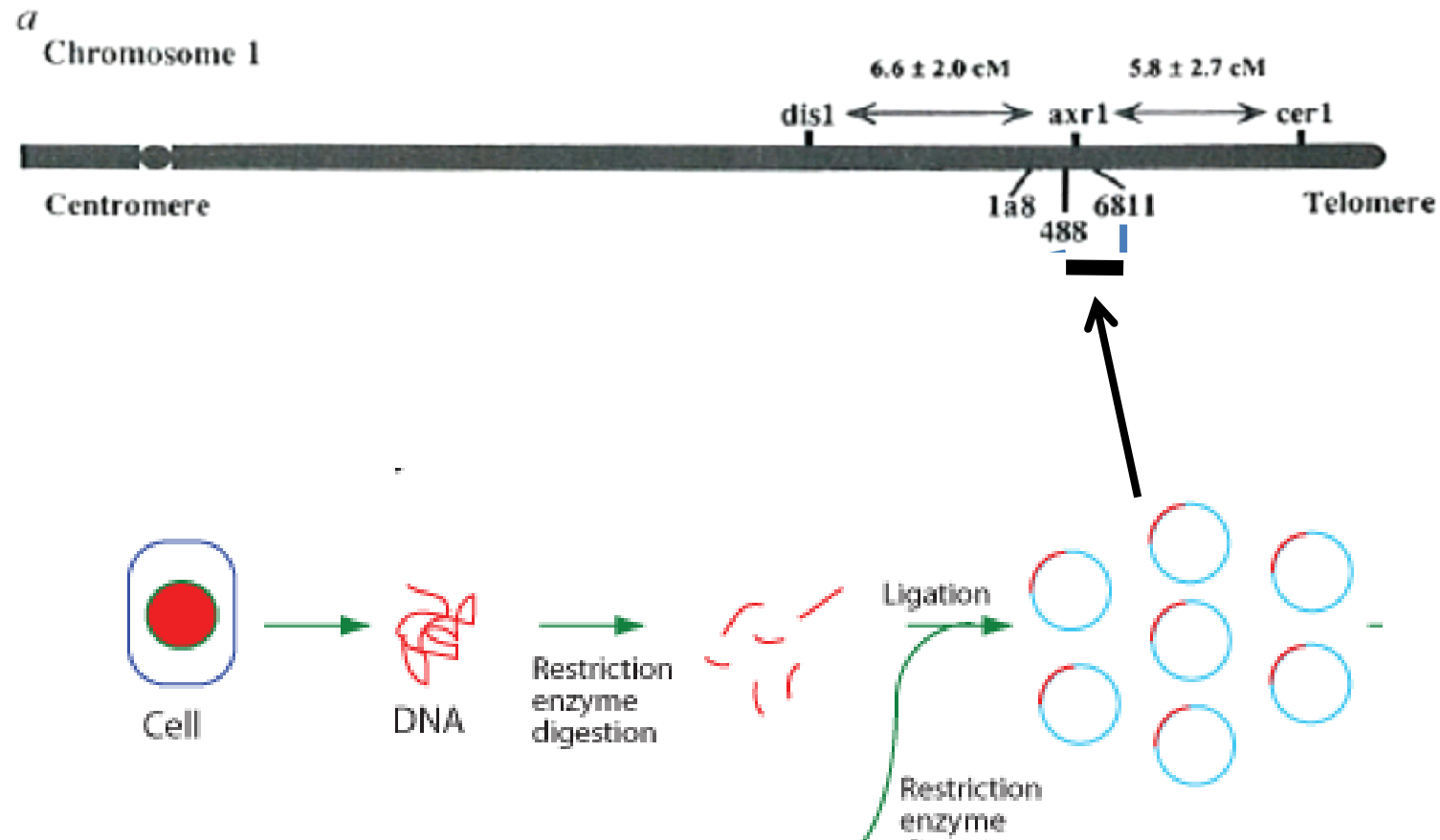
45

300

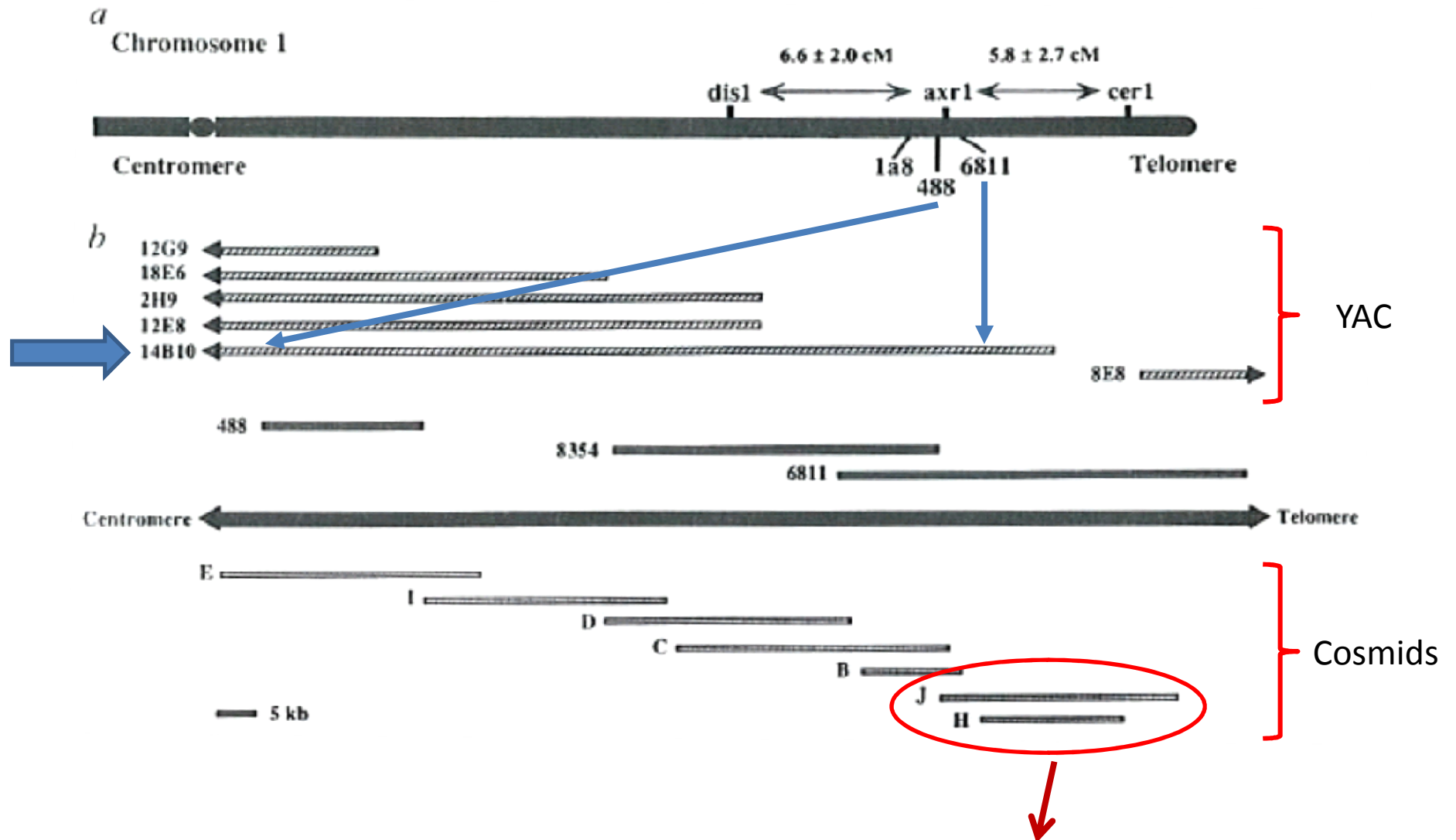
1000



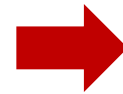
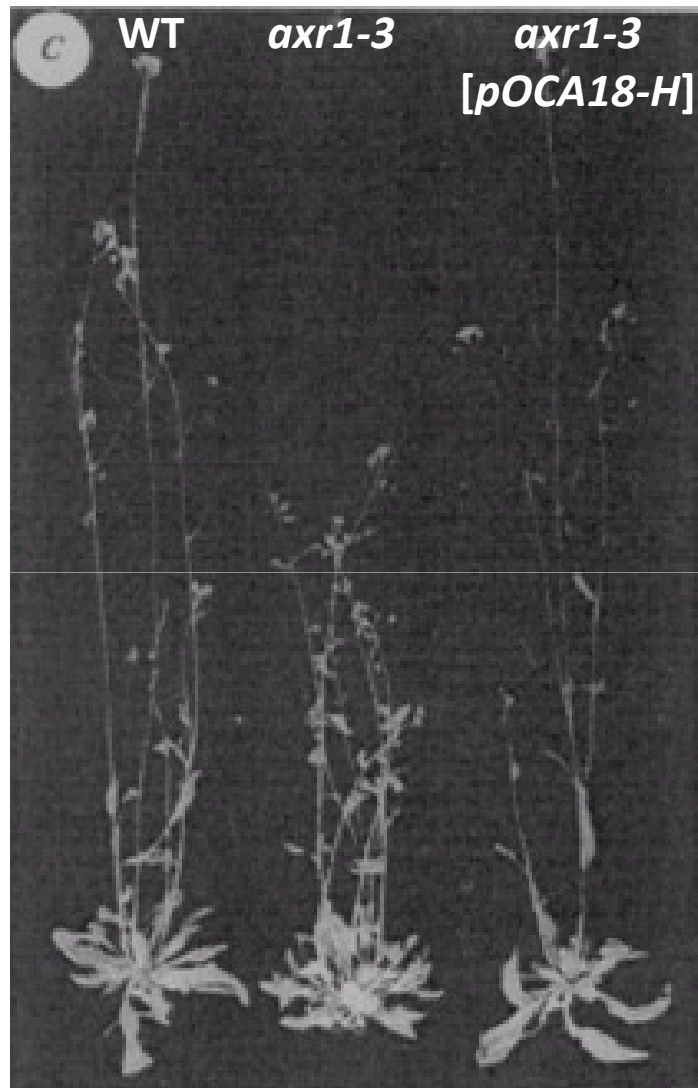
# *AXR1* - Chromosome Walking



# AXR1 - Chromosome Walking



Transformation in *axr1* Mutante = WT Phänotyp?



Cosmid H kann den Phänotyp der *axr1-3* Mutante aufheben

→ Cosmid pOCA18-H enthält das *AXR1* Gen



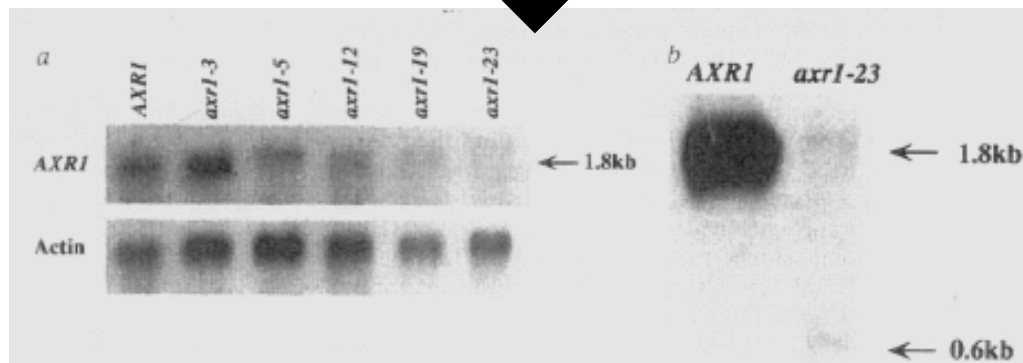
→ Cosmid pOCA18-H (16.5 kb) enthält das *AXR1* Gen

cDNA Bibliothek Screen mit pOCA18-H

→ welche cDNA Klone sind homolog zu pOCA18-H

2 cDNAs identifiziert → 0.8 und 1.8 kb

→ potentielle *AXR1* cDNAs



Northern Blot:  
Wieviel Transkript (1,8 kb) liegt in den *axr1* Mutanten vor?

1.8 kb cDNA abwesend in *axr1-23*!

*axr1-3* = G461A  
↓  
Cystein → Tyrosin

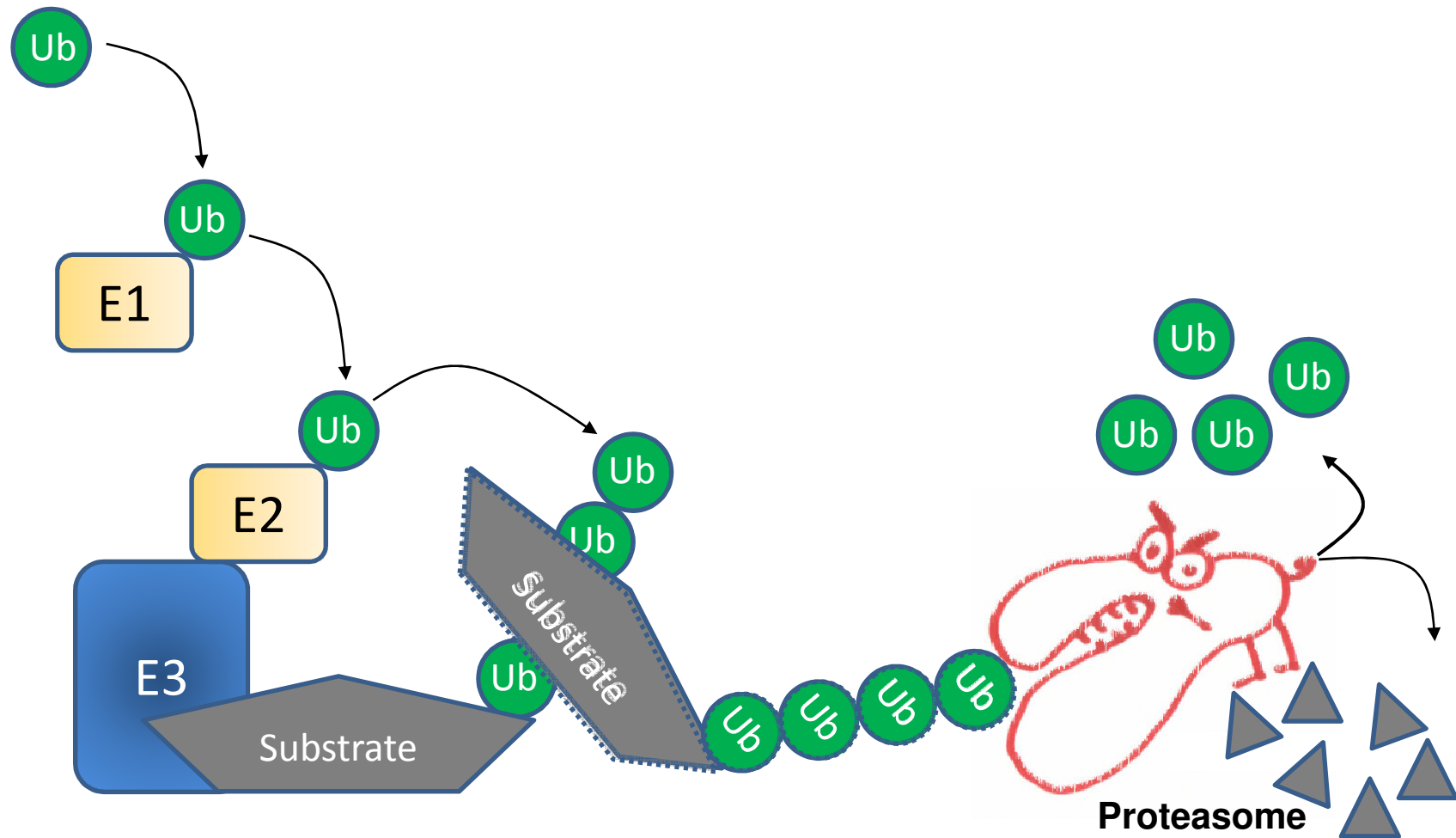
*axr1-12* = C1246T  
↓  
Glycin → STOP

# AXR1 Protein: 540 AS, ca. 60 kD

*axr1-3*  
C→Y

human	M S S S P L S K K R	R V S G P D P K P G	S N C S P A Q S V L	S E V P S V P T N G	MAKNGSEADI	DEGLYSRQLY	60	
yeast	..	..	..	..	..	..	24	
wheat	..	..	..	..	..	..	53	
AXR1	..	..	..	..	..	..	29	
human	V L G H E A M K R L	Q T S S V L V S G L	R G L G V E I A K N	I I L G G V K A V T	L H D Q G T A Q W A	D L S S Q F Y L R E	120	
yeast	V L G K E A M L K M	Q T S S V L I L G L	R G L G V E I A K N	V V L A G V K S M T	V F D P E P V Q L A	D L S T Q F F L T E	84	
wheat	V Y G R E T M K R L	F G S N V L V S G L	Q G L G A E I A K N	L V L A G V K S V T	L H D D G N V E L W	D L S S N F F L S E	113	
AXR1	I W G E V G Q A A L	E E A S I C L L N C	G P T G S E A L K N	L V L G G V G S I T	V V D G S K V Q F G	D L G N N F M V D A	89	
human	E D I G K N R A E V	S Q P R L A E L N S	Y V P V T A Y T G P	L V E . . . . . D	F L S G F Q V V V L	T N T . . P L E D Q L	173	
yeast	K D I G Q K R G D V	T R A K L A E L N A	Y V P V N V L D S L	D D V . . . . . T	Q L S Q F Q V V V A	T D T V S L E D K V	138	
wheat	N D V G Q N R A Q A	C V Q K L Q E L N N	A V L V S A L T G D	L T K . . . . . E	H L S K F Q A V V F	T D . I S L D K A I	166	
AXR1	K S V G Q S K A K S	V C A F L Q E L N D	S V N A K F I E E N	P D T L I T T N P S	F F S Q F T L V I A	T O L V E . D S M L	148	
human	R V G E F C H N . .	R G I K L V V A D T	R G L F G Q L . . .	..	F C D F G E E	M I L T D S N G E Q	P L S A M V S M V T	225
yeast	K I N E F C H S . .	S G I R F I S S E T	R G L F G N T . . .	..	F V D L G D E	F T V L D P T G E E	P R T G M V S D I E	190
wheat	E F D D Y C H S Q Q	P P I A F I K S E V	R G L F G S V . . .	..	F C D F G P E	F T V L D V D G E E	P H T G I V A S I S	220
AXR1	K L D R I C I D A N	V K L V L V R S Y G	L A G F V R I S V K	E H P I I D S K P D	H F L D D L R L N N	P W P E L K S F V E	208	
human	K D N P G V . . .	..	..	..	..	..	249	
yeast	P D . G T . . .	..	..	..	..	..	212	
wheat	N D N P A L . . .	..	..	..	..	..	244	
AXR1	T I D L N V S E P A	A A H K H I P Y V V	I L V K M A E E W A	Q S H S G N L P S T	R E E K K E F K D L	V K S K M V S T D E	268	
human	..	..	..	..	..	..	271	
yeast	..	..	..	..	..	..	244	
wheat	..	..	..	..	..	..	266	
AXR1	D N Y K E A I E A A	F K V F A P R G I S	S E V Q K L I N D S	C A E V N S N S S A	F W V M V A A L K E	F V L N E G G G E A	328	
human	P Y T F S I . C D T	S N F S D Y I . .	..	..	..	..	294	
yeast	P F A F R I . G S V	K E Y G E Y K . .	..	..	..	..	267	
wheat	P Y S F F L E E D T	S S F G A V V . .	..	..	..	..	290	
AXR1	P L E G S I P D M T	S S T E H Y I N L Q	K I Y L A K A E A D	F L V I E E R V K N	I L K K I G R D P S	S I P K P T I K S F	388	
human	V K V P K K I S . .	F K S L V A S L A	E P . D F V V T D F	..	A K F S R P A	Q L H I G F O A L H	Q F C A Q H . G R P	346
yeast	V K V P R K I S . .	F K S L K Q Q L S	N P . E F V F S D F	..	A K F D R A A	Q L H L G F O A L H	Q F A V R H N G E L	320
wheat	V K P P K V I K . .	F K P L K E A M S	E P G E F L M S D F	..	S K F E R P P	L L H L A F O A L D	K F R T . E L S R F	343
AXR1	C K N A R K L K L C	R Y R M V E D E F R	N P S V T E I Q K Y	L A D E D Y S G A M	G F Y I L L R A A D	R F A A . N Y N K F	447	
human	P R P R N E E D A A	E L V A L A G A V N	A R A L P A V Q Q N	..	N L D E D L I R K	L A Y V A A G D L A	P I N A F I G G L A	405
yeast	P R T M N D E D A N	E L I K L V T D L S	V Q Q P E V L G E G	..	V D V N E D L I K E	L S Y Q A R G D I P	G V V A F F G G L V	380
wheat	P V A G S T D D V Q	R V I E Y . A I S	I N D T L G D R K L	..	E E I D K K L L H H	F A S G S R A V L N	P M A A M F G G I V	401
AXR1	P G Q F D G G M D E	D I S R L K T T A L	S L L T D L G C N G	..	S V L P D D L I H E	M C R F G A S E I H	V V S A F V G G I A	507
human	A Q E V M K A C S G	K F M P I M Q W L Y	F D A L E C L P D E	..	K E V L T E D K C L	Q R G N R	450	
yeast	A Q E V L K A C S G	K F T P L K Q F M Y	F D S L E S L P D P	..	K N F P R N E K T T	Q P V N S R Y D N Q	I A V F G L D F O K	440
wheat	G Q E V V K A C S G	K F H P L Y Q F F Y	F D S V E S L P V D	..	..	..	450	
AXR1	S Q E V I K L V T K	Q F V P M L G T Y I	F N G I D H K S Q L	..	..	..	540	

- similarity to ubiquitin-activating enzyme E1
- *axr1-3* mutation alters conserved C- residue into tyrosine
- ubiquitin-proteasome pathway



# preliminary model

